

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204494

(43)Date of publication of application : 31.07.2001

---

(51)Int.CI. C12Q 1/26  
C12Q 1/00  
G01N 27/327  
G01N 33/49

---

(21)Application number : 2000-054786

(71)Applicant : HAYADE KOJI

(22)Date of filing : 25.01.2000

(72)Inventor : HAYADE KOJI

---

## (54) KIT FOR ASSAYING SACCHARIFIED HEMOGLOBIN

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new method for assaying saccharified hemoglobin and fructosylvaline which is a degraded product thereof.

SOLUTION: This method for assaying fructosylvaline is characterized in that a fructosylvaline oxidase acts on the fructosylvaline under one of the following conditions (a) to (c): (a) the reaction solution having pH ≤6; (b) the reaction solution having ≥200 mM electrolyte concentration; and (c) the combination of the conditions (a) and (b).

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-222414  
(43)Date of publication of application : 26.08.1997

---

(51)Int.CI. G01N 27/333  
G01N 27/416

---

(21)Application number : 08-054002 (71)Applicant : NOK CORP  
(22)Date of filing : 16.02.1996 (72)Inventor : GOTO MASAO

---

## (54) DISPOSABLE PH SENSOR

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To make this sensor disposable by a constitution wherein a specific mixture layer is formed on at least one of electrodes of an operation pole and a reference pole.

**SOLUTION:** A mixture material of quinhydrone and chloride is directly coated on an electrode so that it is readily manufactured in low cost. It is unnecessary to use a glass electrode which is easily broken so that it is not durable in the measuring for a long term but sufficient for disposable use and satisfactory reliability in the measuring. It can be effectively used in a wide range such as environmental management (checking of an acidity of river or rain), food management, home medical examination and clinical inspection.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3463069

[Date of registration] 22.08.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-204494

(P2001-204494A)

(43)公開日 平成13年7月31日(2001.7.31)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-ヤ-ト<sup>7</sup>(参考)

C 1 2 Q 1/26

C 1 2 Q 1/26

2 G 0 4 5

1/00

1/00

B 4 B 0 6 3

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 33/49

A

33/49

27/30

3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数8 審査面 (全7頁)

(21)出願番号

特願2000-54786(P2000-54786)

(71)出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(22)出願日

平成12年1月25日(2000.1.25)

(72)発明者 早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

Fターム(参考) 2G045 AA28 BB10 BB14 BB20 BB51

CB21 DA45 DA48 DB21 FB01

FB05

4B063 QA01 QA19 QQ68 QQ79 QR03

QR23 QS39 QX01 QX04

(54)【発明の名称】 糖化ヘモグロビンの測定キット

(57)【要約】

【課題】本発明は糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンHA1c; HbA1c)やその分解産物であるフルクトシルトシリバリンの新規な測定方法を提供する。

【解決手段】本発明はフルクトシリアルアミン酸化酵素の反応条件を鋭意検討した結果、フルクトシリアルアミン酸化酵素を用いてフルクトシリバリンを選択的に反応させる以下のa)~c)のいずれかの反応条件

d) 反応溶液のpHを6以下であること。

e) 反応溶液の電解質濃度が200mM以上であること

f) a)からb)の組み合わせによる反応条件。

(2)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】フルクトシルバリンの測定方法であり、フルクトシルバリンを以下のa)～c)のいずれかの条件のもとでフルクトシルアミン酸化酵素を作用させることを特徴とするフルクトシルバリンの測定方法。

- a) 反応溶液のpHを6以下であること。
- b) 反応溶液の電解質濃度が200mM以上であること
- c) a)からb)の組み合わせによる反応条件

【請求項2】糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンA<sub>1c</sub>; HbA<sub>1c</sub>)の測定方法であり、試料中のHbA<sub>1c</sub>を分解して生成させたフルクトシルバリンを請求項1記載の方法で定量することを含む方法。

【請求項3】請求項1記載の方法を実施するためフルクトシルバリン測定キット。

【請求項4】請求項1記載の方法を実施するための糖化ヘモグロビンの測定キット。

【請求項5】pH6以下で電解質濃度200mM以上であり、*Pichia* sp. N1-1由来のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルバリン測定キット。

【請求項6】請求項1記載の方法を含むフルクトシルバリン測定用酵素センサーシステム。

【請求項7】請求項1記載の方法を含む糖化ヘモグロビンの測定用酵素センサーシステム。

【請求項8】請求項1から7において酵素が*Pichia* sp. N1-1由来のフルクトシルバリン酸化酵素であるもの。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規な糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンA<sub>1c</sub>; HbA<sub>1c</sub>)の測定方法に関する。より詳細には本発明は臨床検査などの分野で利用され、HbA<sub>1c</sub>やその分解産物であるフルクトシルバリンの測定方法ならびにその方法に基づき構築される酵素センサーシステムに関する。

## 【0002】

【従来の技術】蛋白質主鎖および側鎖のアミノ基はグルコースなどの還元糖の還元末端と非酵素的に結合して、アマドリ化合物すなわち糖化蛋白質を生ずる。血中においては、ヘモグロビンが糖化されて糖化ヘモグロビン(グリコヘモグロビン; HbA<sub>1c</sub>)を生ずることが知られている。糖尿病患者では健常人に比べてヘモグロビンに対するHbA<sub>1c</sub>の存在比率が高いこと、およびHbA<sub>1c</sub>の血中濃度は過去数週間の血糖値を反映することから、HbA<sub>1c</sub>血中濃度は糖尿病の診断および糖尿病患者の血糖コントロールの指標として、臨床試験において極めて重要である。

【0003】HbA<sub>1c</sub>においては、ヘモグロビンβ鎖のN末端のバリンにグルコースが結合していることから、フルクトシルバリンをHbA<sub>1c</sub>の低分子モデル化

合物として用いることができる。すなわち、フルクトシルバリンを基質とする酵素を用いて、HbA<sub>1c</sub>をアッセイすることが可能である。

【0004】これまでに、種々の菌株からアマドリ化合物に対して作用する酵素が単離されており、これらの酵素を用いてグリコアルブミン、HbA<sub>1c</sub>およびフルクトサミン等の糖化蛋白質を分析しうることが示唆されている(特開昭61-268178、特開昭61-280297、特開平3-155780、特開平5-192193、特開平7-289253、特開平8-154672、Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110, 1989, Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338, 1991, J. Biol. Chem., 269(44), 27297-27302, 1994, Appl. Environ. Microbiol., 61(12), 4487-4489, 1995, Biosci. Biotech. Biochem., 59(3), 487-491, 1995, J. Biol. Chem., 270(1), 218-224, 1995, J. Biol. Chem., 271(51), 32803-32809, 1996, J. Biol. Chem., 272(6), 34337-3443, 1997)。

【0005】しかし、これまでに報告されているフルクトシルアミン酸化酵素を用いて、糖化ヘモグロビンに存在し、糖化ヘモグロビン含量の指標となるフルクトシルアミン化合物である'フルクトシルバリンと、糖化アルブミンの主な分解産物として知られるフルクトシルアミン化合物であるフルクトシルリジンとを区別することは困難であった。

【0006】これはこれまでに報告されているフルクトシルアミン酸化酵素の基質特異性に起因するものである。したがって、フルクトシルアミン酸化酵素をフルクトシルバリンに選択的に反応させることが期待されていた。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンHA<sub>1c</sub>; HbA<sub>1c</sub>)やその分解産物であるフルクトシルトシリバリンの新規な測定方法ならびにその方法に基づき構築される分析キットおよび酵素センサーシステムを提供する。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明はフルクトシルアミン酸化酵素の反応条件を鋭意検討した結果、フルクトシルアミン酸化酵素を用いてフルクトシルバリンを選択的に反応させる条件を見出した。

【0009】すなわち、フルクトシルバリンとフルクトシルリジンを同等、あるいはフルクトシルリジンをより選択的に基質とするフルクトシルアミン酸化酵素の基質特異性をフルクトシルバリンに選択的に反応させるため

(3)

3

の以下の a) ~ c) のいずれかの反応条件

- a) 反応溶液の pH を 6 以下であること。
- b) 反応溶液の電解質濃度が 200 mM 以上であること
- c) a) から b) の組み合わせによる反応条件

を提供する。本発明はまた、HbA1c 分解して得られるフルクトシルバリンあるいはフルクトシルバリンを上記反応条件のもとでフルクトシルアミン酸化酵素と反応させることにより測定することを特徴とする測定方法を提供する。

【0010】本発明はまた、上記記載の方法を実施するためのフルクトシルバリン測定キットを提供する。

【0011】本発明はまた、上記記載の方法でフルクトシルバリンを測定することを実施するための糖化ヘモグロビンの測定キットを提供する。

【0012】本発明はさらに本発明の測定方法に基づき構築される HbA1c あるいはフルクトシルバリン計測用の酵素センサーシステムを提供する。

【0013】本発明はさらに本発明の HbA1c あるいはフルクトシルバリンの測定方法ならびに分析キットにおいてそのフルクトシルアミン酸化酵素が Pichia s.p. N1-1 株由来のフルクトシルアミン酸化酵素であるものを提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の方法において用いるフルクトシルアミン酸化酵素は本発明を達成できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、フルクトシルアミン酸化酵素を産生する微生物を用いて製造することができる。その様な微生物の例としては、Pichia s.p. N1-1 株 (FERM P-17326) が挙げられる。微生物をフルクトシルバリンを含む適当な天然または合成培地で培養する。フルクトシルバリンを唯一の窒素源とする培地を用いて、フルクトシルバリン酸化酵素を誘導することにより、酵素の収率を高めることができる。フルクトシルバリンを唯一の窒素源とする培地としては、最少培地 (例えば M9S) にフルクトシルバリンを添加したものが挙げられる。培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、フルクトシルバリン酸化酵素を含む水溶性画分を得ることができる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLC などにより精製することにより、フルクトシルアミン酸化酵素を調製する。本発明におけるフルクトシルバリンあるいは、HbA1c を酵素的あるいは化学的に分解し生成したフルクトシルバリンを測定する方法は、以下に示す a) ~ c) の条件のもとでフルクトシルアミン酸化酵素をこれらの基質に作用させる。フルクトシルバリンを同条件下で特異的に酸化するフルクトシルアミン酸化酵素としては上記で調製した Pichia s.p. N1-1 由来フルクトシルアミン酸化酵素などを使用することが

(3)

4

できる。

- a) 反応溶液の pH を 6 以下であること。
- b) 反応溶液の電解質の濃度が 200 mM 以上であること
- c) a) から b) の組み合わせによる反応条件

【0015】フルクトシルアミン酸化酵素の基質選択性は、反応溶液の pH が 7 近辺では、図 1 に示されるように、フルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比は 2 以下であり、この 2 基質を区別する観点において実用上問題がある。しかし pH の低下とともにフルクトシルバリンに対する反応比が向上し、pH 6 以下、好ましくは pH 5.5 以下、より好ましくは pH 5.0 以下では比活性は 2 以上となり、実用上十分に利用でき、フルクトシルバリンに対する選択性が高くなる。

【0016】さらにフルクトシルアミン酸化酵素の基質選択性は、反応溶液中の電解質濃度が図 2 および 3 に示すように、200 mM 以下では、フルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比は 2 以下であり、この 2 基質を区別する観点において実用上問題がある。しかし、反応溶液中の電解質濃度の増加とともに反応比が向上し、反応溶液の電解質濃度が 200 mM 以上、好ましくは 300 mM 以上、より好ましくは 400 mM 以上では比活性は 2 以上となり、実用上十分に利用でき、フルクトシルバリンに対する選択性が高くなる。

【0017】酵素活性の測定

フルクトシルアミン酸化酵素活性は、酵素反応により消費される酸素の量または発生する過酸化水素の量を定量することにより測定することができる。当該技術分野においては、酸素および過酸化水素を定量する種々の方法が知られている。例えば、恒温セルにフルクトシルバリン酸化酵素およびメディエーターを含む緩衝液を入れて一定温度に維持し、ここにフルクトシルバリンを含む試料を加え、酸化還元色素の呈色反応をモニターすることにより、フルクトシルアミン酸化酵素の活性を測定することができる。あるいは、ペルオキシダーゼを用いて発生する過酸化水素を定量することができる。このような測定系としては、ペルオキシダーゼ～4-アミノアンチピリシン系が知られており、種々の実験書 (例えば生物工学実験書 社団法人生物工学会編、培風館平成 4 年) に記載されている。

【0018】さらに同様にしてフルクトシルアミン酸化酵素の電子受容体として酸素ではなく、種々の人工電子メディエーターを利用することができる。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。

【0019】アッセイキット

別の観点においては、本発明は、上記方法を実施するた

(4)

5

めのフルクトシルバリンアッセイキットを特徴とする。本発明のフルクトシルバリンアッセイキットは、本発明に従うフルクトシルバリン酸化酵素の測定条件を備えた反応液を少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、フルクトシルアミン酸化酵素と本発明の条件下したがったアッセイに必要な緩衝液、適当なメディエーター、および必要な場合にはペルオキシダーゼ等の酵素、キャリブレーションカーブ作製のためのフルクトシルバリンもしくはその誘導体の標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従うフルクトシルバリン分析キットは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0020】さらに別の観点においては、本発明はHb A1cアッセイキットを特徴とする。Hb A1cを酵素的または化学的に分解することによりフルクトシルバリンが生成し、これを本発明のフルクトシルバリン分析キットを用いて定量することによりHb A1cをアッセイすることができる。したがって、本発明のHb A1cアッセイキットは、上述のフルクトシルバリンアッセイキットにさらに加水分解試薬または蛋白質分解酵素を含む。

#### 【0021】酵素センサーシステム

別の観点においては、本発明は、フルクトシルバリン計測用センサーシステムおよびHb A1c計測用センサーシステムを特徴とする。本発明のセンサーシステムを用いて、本発明の反応条件下でフルクトシルアミン酸化酵素の作用により消費される酸素または発生する過酸化水素を計測することにより、基質であるフルクトシルバリンの濃度を決定することができる。酸素または過酸化水素を測定する種々のセンサー系が当該技術分野において知られている。電極としては、酸素電極、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、これらを組み合わせて用いてよい。

【0022】酸素電極を用いる場合には、電極表面に酵素を固定化して、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。ここに試料を加えて電流の減少値を測定する。

【0023】カーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する場合には、作用電極として酵素を固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、メディエーターを含む緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどの電子メディエータを吸着あるいは共有結合法により高分子マトリックスに固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。

(4) 6  
どを用いることができる。

【0024】あるいは同様の酵素電極を本発明の反応条件のもとで酵素反応の結果生成する過酸化水素を測定することによっても分析に用いることができる。すなわち、作用電極として酵素を固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、本発明の条件下の緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて酵素反応の結果生じる過酸化水素に起因する電流の増加値を測定する。図5に、フルクトシルアミン酸化酵素と白金電極を組み合わせた酵素センサーシステムの概略図を示す。

【0025】さらにカーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する方法として、固定化電子メディエータを用いる系がある。すなわち、作用電極として酵素およびフェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどの電子メディエータを吸着あるいは共有結合法により高分子マトリックスに固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。

【0026】いずれの電極を用いる場合にも、標準濃度のフルクトシルバリン溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のフルクトシルバリン濃度を求めることができる。Hb A1c計測用センサーシステムとして用いる場合は、上述のフルクトシルバリン計測用センサーシステムに、さらに蛋白質分解酵素（例えばプロテアーゼ）を固定化した膜などを組み合わせて、複合センサーシステムを構築する。このような、複数の酵素の組み合わせによる連続的反応を用いる複合センサーシステムの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えば Biosensors - Fundamental and Applications - Anthony P. F. Turner, Isao Karube and George S. Wilson, Oxford University Press 1987に記載されている。

【0027】以下、実施例に基づき本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

最少培地 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{NaCl}$  3%,  $\text{MgSO}_4$  0.01%,  $\text{CaCl}_2$  0.01%, D-グルコース 1%) 150mlに、窒素源として終濃度 0.52% のフルクトシルバリンを添加した培地で培養した。この培地を用いて、Pichia sp. N1-1を培養し、得られた菌体を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて洗浄す

(5)

7

る。この菌体を酵素 Zymolyase によって消化し細胞を破碎する。この破碎液を超遠心分離 (4000 r p.m.、20 min) の後、その上清を凍結乾燥し、濃縮する。この酵素濃縮液を酵素試料として用いる。あるいはさらに陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した酵素標品を用いることもできる。このようにして得られたフルクトシルアミン酸化酵素 (FAO) を用いて、フルクトシルバリンの選択性の pH 依存性を以下のように検討した。緩衝溶液としては pH 4.9 ~ 8.2 に調整した 0.5 M の McIlvaine 緩衝溶液を用いた。活性測定はフルクトシルアミン類の酸化に基づき発生する過酸化水素をペルオキシダーゼ～4-アミノアンチビリン系で測定した。基質としてフルクトシルバリンとフルクトシルリジンを用いたときの酵素活性の pH 依存性を図 1 に示す。本緩衝液中においては pH 7.0 以上ではフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は 1.5 以下であった。しかし pH の低下とともにフルクトシルバリンに対する反応比が向上し、pH 4.9 においてはフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は 5 となり、フルクトシルバリンに対して選択性が高くなつた。

#### 実施例 2

実施例 1 と同様に Pichia sp. N1-1 由来 FAO を用いて FAO の選択性の緩衝溶液濃度の依存性を検討した。緩衝溶液としては pH 7.0 に調整した 5 mM ~ 500 mM のリン酸カリウム緩衝溶液を用いた。活性測定はフルクトシルアミン類の酸化に基づき発生する過酸化水素をペルオキシダーゼ～4-アミノアンチビリン系で測定した。基質としてフルクトシルバリンとフルクトシルリジンを用いたときの酵素活性の緩衝溶液濃度依存性を図 2 に示す。本緩衝液中においては 5 mM ~ 100 mM 付近では、フルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比は 1.5 以下であった。しかし緩衝溶液の濃度の増加とともにフルクトシルバリンに対する反応比が向上し、500 mM においてはフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は 8.5 となり、フルクトシルバリンに対して選択性が高くなつた。

#### 実施例 3

実施例 1 と同様に Pichia sp. N1-1 由来 FAO を用いて FAO の選択性の緩衝溶液中の NaCl 濃度の依存性を検討した。緩衝溶液としては pH 7.0 に調整した 10 mM のリン酸カリウム緩衝溶液を用い、NaCl 濃度は 0 ~ 1000 mM の間で検討した。活性測定はフルクトシルアミン類の酸化に基づき発生する過酸化水素をペルオキシダーゼ～4-アミノアンチビリン系で測定した。基質としてフルクトシルバリンとフルクトシルリジンを用いたときの酵素活性の緩衝溶液中の Na

10

C1 濃度依存性を図 3 に示す。本緩衝液中においては NaCl 濃度 0 mM ~ 50 mM 付近ではフルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比 1.5 以下であった。しかし緩衝溶液中の NaCl の濃度の増加とともにフルクトシルバリンに対する反応比が向上し、NaCl 濃度 500 mM においてはフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は 3 となり、フルクトシルバリンに対して選択性が高くなつた。

#### 実施例 4

実施例 2 と同様に Fusarium oxysporum f. sp. fragariae (IFO 31180) 由来 FAO を用いて FAO の選択性の緩衝溶液濃度の依存性を検討した。IFO 31180 は最少培地 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%, NaCl 3%, MgSO<sub>4</sub> 0.01%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, D-グルコース 1%) 150 ml に、窒素源として終濃度 0.52% のフルクトシルリジンを添加した培地で培養した。えられた菌体を洗浄後、ガラスピーズで破碎した。この破碎液を遠心分離 (5000 g、20 min) によって調製した上清を 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で一晩透析の後、凍結乾燥により濃縮した。このようにして調製した酵素濃縮液を酵素試料として用いた。緩衝溶液としては pH 7.0 に調整した 5 mM ~ 500 mM のリン酸カリウム緩衝溶液を用いた。活性測定はフルクトシルアミン類の酸化に基づき発生する過酸化水素をペルオキシダーゼ～4-アミノアンチビリン系で測定した。基質としてフルクトシルバリンとフルクトシルリジンを用いたときの酵素活性の緩衝溶液濃度依存性を図 4 に示す。本緩衝液中においては 5 mM ~ 50 mM 付近ではフルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比は 1.5 以下であった。しかし緩衝溶液の濃度の増加とともにフルクトシルバリンに対する反応比が向上し、500 mM においてはフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は 8.5 となり、フルクトシルバリンに対して選択性が高くなつた。

#### 実施例 5

実施例 1 と同様に Pichia sp. N1-1 由来 FAO を調製して、同酵素を用いたフルクトシルアミン類計測用の酵素センサーシステムを構築した。センサーシステムの構成図を図 5 に示す。同酵素を 0.03 U 含む 50 μリットルのリン酸緩衝液をろ紙に含浸させ、これを直径 3 ミリメートルの BAS 社製の白金電極上に装着し、これを透析膜で覆った。本酵素センサーを 500 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.0 あるいは 10 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.0 に浸漬した。測定は、フルクトシルバリンあるいはフルクトシルリジン 1 mM 添加時の酵素セ

8

(6)

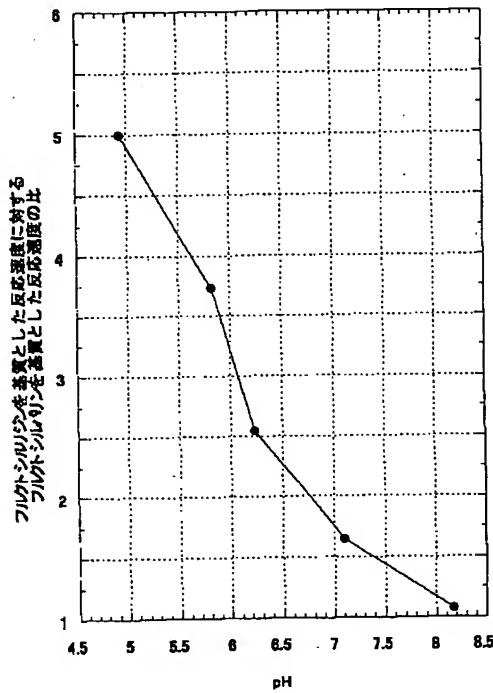
9

ンサーの信号を25℃で、印加電位600mV vs Ag/AgClとしてフルクトシルアミン類の酸化により生じた過酸化水素を測定した。FAOの選択性の緩衝溶液濃度の依存性を検討した。緩衝溶液としてはpH 7.0に調整した10mMリン酸カリウム緩衝溶液を用いたときにはフルクトシルリジンを基質とした時の酵素活性に対するフルクトシルバリンを基質とした時の酵素活性の比は1.0であった。しかし500mMにおいてはフルクトシルリジンに対する酵素活性のフルクトシルバリンに対する酵素活性の比は4.5となり、フルクトシルバリンに対して選択性が高くなつた。

【図面の簡単な説明】

【図1】は酵素として*Pichia* sp. N1-1由来フルクトシルアミン酸化酵素を用いたときの、フルクトシルバリンへの酵素反応の選択性のpH依存性

【図1】



10

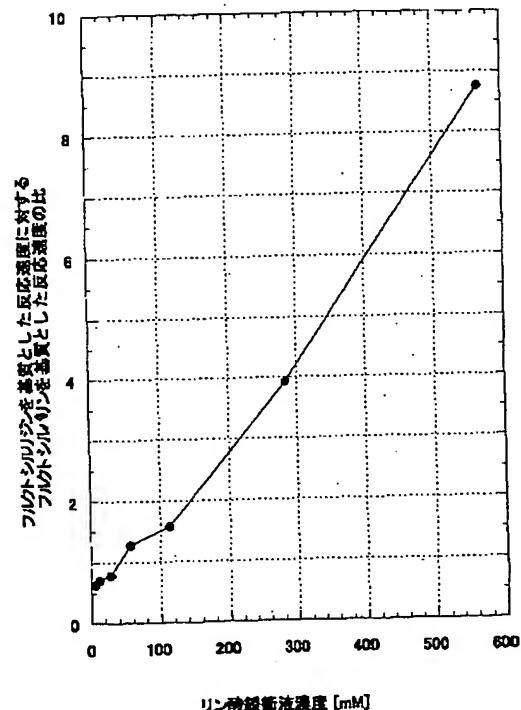
【図2】は酵素として*Pichia* sp. N1-1由来フルクトシルアミン酸化酵素を用いたときの、フルクトシルバリンへの酵素反応の選択性のリン酸緩衝液濃度依存性

【図3】は酵素として*Pichia* sp. N1-1由来フルクトシルアミン酸化酵素を用いたときの、フルクトシルバリンへの酵素反応の選択性のNaCl濃度依存性

【図4】は酵素として*Fusarium* IFO31180フルクトシルアミン酸化酵素を用いたときの、フルクトシルバリンへの酵素反応の選択性のリン酸緩衝液濃度依存性

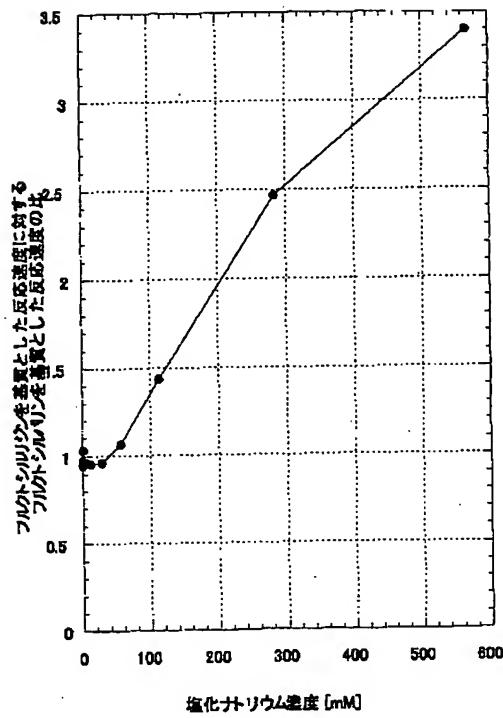
【図5】は酵素として*Pichia* sp. N1-1由来フルクトシルアミン酸化酵素を用いて構築した酵素センサーシステム構成図

【図2】

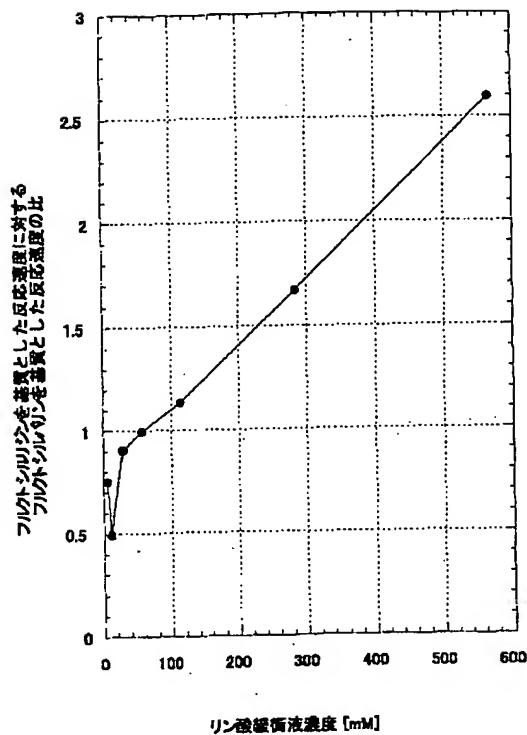


(7)

【図3】



【図4】



【図5】

